

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVI, 1

SECTIO D

1971

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Pracownia Cytologii Doświadczalnej. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Hanna KARWACKA

Badania elektronomikroskopowe fibroblastów w procesie starzenia się hodowli tkankowej

Электронномикроскопические исследования клеток в процессе старения тканевой культуры

Electronmicroscopic Studies of Fibroblasts in the Process of Ageing of Tissue Culture

Fischer (1946) oraz de Robertis i wsp. (1969) omawiając proces starzenia się komórek w hodowli tkankowej zwrócili uwagę na czynniki endogenne, a przede wszystkim egzogenne, które odgrywają ważną, a nawet zasadniczą rolę w wywołaniu i przebiegu całego procesu. Autorzy ci podkreślili także, że starzeniu się komórki towarzyszy starzenie się jej środowiska zewnętrznego, w którym postępujący brak substancji odżywczych i nagromadzenie się produktów metabolizmu prowadzi w końcowym etapie do katabiozy, a więc do nieodwracalnego ustania zjawisk życiowych. Podobnie uważali między innymi: Bickley, Harmon (1965), Honjo, Ichio (1968), Ketz, Hans-Albrecht (1965) i Kohn, Roy (1965).

Analiza omawianych czynników prowadzona na hodowlach tkankowych przy użyciu współczesnych metod biochemicznych, cytochemicznych, interferometrycznych, refraktometrycznych i autoradiograficznych w ostatnich latach została uzupełniona badaniami w mikroskopie elektronowym przez Cohena (1961), Fortaka i wsp. (1968), Kochhnara (1968), Levinthala (1968) i innych. Poddano więc obserwacjom zachowanie się błony komórkowej, jądra, jąderka i organelli w jedno i kilkudniowych hodowlach, zwracając szczególną uwagę na postępujące zaburzenia w przemianie materii.

Mimo szczegółowych badań nie udało się dotychczas przeprowadzić dokładnej granicy między cytofizjologią starzenia się hodowli a cytopatologią tego procesu, stąd też zagadnienia czynników wzmagających lub hamujących przejawy życiowe komórki są zagadnieniami otwartymi i wymagają dalszych badań. W badaniach naszych postanowiono przeanalizować w mikroskopie elektronowym zachowanie się fibroblastów w hodowli tkankowej na starzejącym się podłożu.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Trypsynizowane fibroblasty mysie szczepu L otrzymane z Zakładu Wirusologii Instytutu Weterynarii w Puławach były namnażane w butelkach Legroux i zawieszane w pożywce zawierającej płyn Parkera Hanksa (w stosunku 1:1) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Komórki hodowano przez

24, 48, 72, 96, 120, 144 godzin nie zmieniając środowiska. Średnie inoculum użytej do badań hodowli wynosiło około 100 tys. komórek zawieszonych w 1 ml pożywki. Do badań w mikroskopie elektronowym wykorzystano zmodyfikowaną metodę opartą na technice Raynolda (1964). Komórki otrzymane w różnym stadium wzrostu zdejmowano bagietką szklaną, przenoszono do probówek, wirowano przy 1000 obrotów/1 min. w ciągu 5 min. i utrwalano w roztworze czterotlenku osmu zbuforowanym w buforze fosforanowym do pH 7,2, a po 2 godzinach dotrwalano przez 10 min. w 1% roztworze $KMnO_4$ z dodatkiem buforu fosforanowego o pH 7,2. Następnie przemywano roztworem Ringera przez 15 minut. Komórki odwadniano w acetonie o wzrastającym stężeniu i zatapiano w westopalu. Skrawki grubości ca 600Å otrzymywane w mikrotomie Porter-Blum umieszczano na siateczkach miedzianych pokrytych błoną z formvaru (0,8% formvaru w chlorku etylenu). Dla otrzymania kontrastu barwiono skrawki 8% octanem uranu w 0,5% kwasie octowym przez 30 min., następnie płukano, suszono i ponownie barwiono cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym L. Philipsa E. M.-100, na materiale negatywowym Orwo Elektronenplatten.

BADANIA WŁASNE

Fibroblasty hodowli jednodniowej (24 godz.)

W hodowli jednodniowej komórki miały kształt okrągły lub owalny. Posiadały błonę plazmatyczną z licznymi wypustkami oraz tubularnymi i wakuolarnymi wgłębieniami (ryc. 1, 2). Jądro było zwykle okrągłe, otoczone porowatą podwójną błoną, podobnie jak w innych komórkach (ryc. 1). Ziarna chromatynowe gromadziły się w większych lub mniejszych skupieniach kariosomalnych przy wewnętrznej powierzchni błony jądrowej. Najczęściej spotykało się jedno lub dwa jąderka, wykazujące dużą zmienność rozmiarów. W tej samej komórce różniły się one kształtem, wielkością, oraz gęstością elektronową. Mitochondria kształtu pałeczkowatego, zawierały liczne, prostopadłe do długiej osi grzebienie mitochondrialne. Rozmieszczone one były w całej cytoplazmie ze szczególnym nagromadzeniem w okolicy jądra (ryc. 1, 2). Spotykało się także przestrzenie endoplazmatyczne otoczone błonami szorstkimi (ryc. 2). Rybosomy i polirybosomy rozproszone były po całej cytoplazmie (ryc. 1, 2). Cytoplazma zawierała wakuole elektronowo jasne różnej wielkości, w których obserwowano się nieliczne pęcherzyki (ryc. 2).

Fibroblasty hodowli dwudniowej (48 godz.)

Komórki z hodowli dwudniowej nie zmieniły kształtu, jedynie wypustki protoplazmatyczne wydłużyły się nitkowato i wzmógł się proces pinocytozy, o czym świadczy duża liczba pęcherzyków wakuoli pinocytotycznych (ryc. 3, 4) umiejscowionych — jedno pod powierzchnią zewnętrzną (drobne), a inne rozrzucone po całej cytoplazmie (duże), otoczone cienką błoną. U większości komórek struktury jądra i jąderka podobne były do opisanych w populacji jednodniowej (ryc. 4). W mitochondriach kształtu owalnego lub okrągłego gęsta elektronowo macierz kryła dużą liczbę grzebieni (ryc. 4). Rybosomy i polirybosomy jedno były rozsiane po cytoplazmie (ryc. 4), inne należały do alfa cytomembran szorstkich, otaczających przestrzenie endoplazmatyczne (ryc. 4). Najwięcej rybosomów wolnych znajdowało się dookoła jądra,

dzięki czemu gęstość elektronowa stref sąsiadujących była duża (ryc. 4). Obok wakuoli elektronowo jasnych bezstrukturalnych znajdowały się fagosomy wypełnione elementami ziarnistymi różnej gęstości elektronowej (ryc. 4).

Fibroblasty hodowli trzydniowej (72 godz.)

W trzecim dniu hodowli cytoplazma fibroblastów traciła wakuole elektronowo przejrzyste na korzyść wzrastającej liczby ciałek wielopęcherzykowych (ryc. 6). Nastąpił duży spadek gęstości elektronowej jądra komórkowego (ryc. 5, 6). Rozproszona chromatyna grupowała się w środkowej i zewnętrznej części jądra (ryc. 5). W niektórych komórkach obserwowano się zanik struktur jąderkowych (ryc. 5, 6). W środkowej części cytoplazmy grupowały się mitochondria o zmienionych kształtach. Obok mitochondrii opisanych w drugim dniu hodowli, spotykało się gęste duże i wydłużone formy (ryc. 5, 6). Widoczne były grzebienie mitochondrialne przebiegające prostopadle, ukośnie lub podłużnie do długiej osi (ryc. 5, 6). Zwracały uwagę liczne struktury Golgiego o typowej budowie obserwowane w strefie przyjądrowej i w środkowej części cytoplazmy (ryc. 5). Utworzone one były z kilku lub kilkunastu gładkich błon ułożonych zawsze równolegle względem siebie i z licznych pęcherzyków różnej wielkości. Kanały retikulum endoplazmatycznego o szorstkich błonach były dobrze widoczne, umiejscowione przeważnie na obwodzie komórki i także w okolicy jądra (ryc. 6). Zmniejszyła się liczba wolnych rybosomów rozrzuconych po całej cytoplazmie (ryc. 6). W trzecim dniu hodowli zauważało się już brak wakuoli elektronowo jasnych i wgłębień pinocytotycznych (ryc. 5). Zwracały również uwagę tzw. pinosomy, które powstawały przez wnikanie do wakuoli i obecność w nich elektronowo jasnych pęcherzyków (ryc. 6).

W bliskim sąsiedztwie, a niejednokrotnie w bezpośrednim związku z pinosomami widać było wakuole elektronowo gęste otoczone wyraźną błoną (ryc. 6). Były to fagosomy, które — jak się przypuszcza — w późniejszym stadium przechodzą w ciała gęste (widoczne na ryc. 6) w postaci tworów otoczonych błoną. Ciała gęste często obserwowano się w bezpośrednim sąsiedztwie wakuoli fagocytotycznych (ryc. 6), które zawierały albo ciała gęste, albo drobne ziarnistości (ryc. 6).

Fibroblasty hodowli czterodniowej (96 godz.)

W mało zróżnicowanej cytoplazmie komórek w czwartym dniu hodowli spotykało się nieliczne elementy wewnątrzkomórkowe najczęściej skupione na jednym biegunie komórki i otoczone szorstkimi błonami (ryc. 7, 8). Błona komórkowa miała nieliczne kopułkowane i palczaste mikrowypustki protoplazmatyczne (ryc. 7). W jednych komórkach jądro zawierało rozproszone ziarna chromatynowe (ryc. 7), w innych chromatyna była głównie zgromadzona przy błonie jądrowej (ryc. 8). U większości komórek obserwowano się zanik struktur jąderkowych (ryc. 7). Zaokrąglone mitochondria o zagęszczonej strukturze znajdowały się na jednym biegunie komórki (ryc. 7, 8). Struktury Golgiego były nadal dobrze rozwinięte z widocznymi blaszkami i pęcherzykami opisanymi w trzecim dniu hodowli (ryc. 9).

Zwiększyła się liczba błon siatki endoplazmatycznej (ryc. 7, 8). Na błonach retikulum endoplazmatycznego widoczne były rybosomy, było ich jednak znacznie mniej niż w trzecim dniu hodowli (ryc. 7, 8). Zmniejszona była także liczba wolnych rybosomów rozrzuconych po całej cytoplazmie (ryc. 9). Mikropinocytoza prawie zupełnie ustała. Spotykało się niewiele komórek mających jeszcze od kilku do kilkunastu pęcherzyków mikropinocytotycznych umiejscowionych przy błonie komórkowej (ryc. 7). Tylko w niewielkiej liczbie komórek zauważono wzrost wakuoli pinocytotycznych grupujących się najczęściej w okolicy struktur Golgiego (ryc. 9), przeważnie jednak obserwowano komórki o bardzo małej liczbie wakuoli. W komórkach w czwartym dniu hodowli zaobserwowano liczne ciała gęste (ryc. 8, 9). Najczęściej znajdowały się w okolicy struktur Golgiego (ryc. 9). We wnętrzu ciałek gęstych widoczna była duża liczba ziarnistości elektronowo gęstych (ryc. 8, 9).

Fibroblasty hodowli pięciodniowej (120 godz.)

Fibroblasty obserwowane w piątym dniu hodowli zawierały elementy wewnątrzkomórkowe zmienione, które ulegały degeneracji (ryc. 10, 11, 12). Prawie całkowicie zanikła błona komórkowa, pozostało jedynie wąskie pasmo cytoplazmy otaczającej jądro (ryc. 10). Jądro w tych komórkach utrzymywało wyraźną, podwójną błonę jądrową, w której widoczne były szerokie pory i szerokie pęcherzykowate rozstępy pomiędzy błonami zewnętrzną i wewnętrzną (ryc. 11, 12). Obserwowano zaledwie wąskie pasmo chromatyny, umiejscowione przy błonie jądrowej. W środkowej części niektórych jąder spotykało się grudki chromatyny (ryc. 10, 11, 12). Nie zauważono mitochondrii, struktur Golgiego, błon siatki endoplazmatycznej, ani wolnych rybosomów i polirybosomów, a wielokształtne pęcherzyki i wakuole mogły świadczyć o ich spęcznieniu. Wydaje się, że w tym okresie hodowli następuje upłynnienie struktur cytoplazmy łącznie ze zmianami nekrobiotycznymi w karioplazmie (ryc. 11, 12).

Fibroblasty hodowli sześciodniowej (144 godz.)

Najczęściej spotykanym obrazem komórek obserwowanych w szóstym dniu hodowli były jądra komórkowe i nieliczne pęcherzyki upłynnionej cytoplazmy (ryc. 14). Nastąpił zanik struktury wewnątrzjądrowej. Pozostało niewielkie pasmo chromatyny jądrowej grupującej się przeważnie na krawędzi błony jądrowej. W jądrze najdłużej utrzymywała się podwójna błona jądrowa z dużą liczbą por. W niektórych komórkach widoczne były jądra zbudowane z mocno zagęszczonego zrębu chromatynowego i otoczone resztkami cytoplazmy, która uległa destrukcji. Były to jądra pyknotyczne (rys. 13).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Pod pojęciem starzenia się, zachodzącym w hodowli tkanek można rozumieć dwa zjawiska, tzw. starzenie się hodowli komórkowej, występujące pod wpływem nieznanymi czynników, i starzenie się komórek zachodzące wskutek wyczerpania składników odżywczych lub nagromadzenia substancji toksycznych w hodowlach,

w których przez długi okres nie zmieniano pożywki [Hanks (1948), Kaplan i inni (1959), Palmer (1961), Hayflick (1965), Stockwell (1965)]. Ze względu na wagę zagadnienia podjęto przy użyciu mikroskopu elektronowego próbę prześledzenia stopniowych zmian zachodzących w ustalonej linii fibroblastów L, pozostawionych w niezmienianej pożywce aż do czasu ich całkowitej destrukcji.

Komórki szczepu L w pierwszym dniu hodowli miały pofałdowaną błonę komórkową z licznymi wgłębieniami i wypustkami protoplazmatycznymi. Znaczne zwiększenie się wgłębień błony komórkowej w drugim dniu hodowli związane było z intensywną pinocytozą, a tym samym zwiększeniem systemu wakuolarnego. Kochhnar (1968) uważa, że zwiększona pinocytoza powoduje wyraźne pofałdowanie błony komórkowej. Komórki obserwowane po dalszych dniach inkubacji straciły prawie zupełnie wyrostki protoplazmatyczne i wgłębienia błony komórkowej, która uległa wygładzeniu. Komórki pod koniec prowadzonych obserwacji uległy lizie i miały uszkodzoną, poprzerwaną, nie kompletną błonę komórkową.

W komórkach obserwowanych w pierwszym dniu inkubacji jądra fibroblastów szczepu L wykazywały dużą zmienność morfologiczną w miarę starzenia się środowiska odżywczego. Występowały zazwyczaj gęste elektronowo ziarnistości karioplazmy i wyraźne jąderko. Jądro dość często posiadało pofałdowaną błonę jądrową. W hodowli komórek dwudniowych zmniejszyła się nieznacznie gęstość elektronowa jądra. W jąderku nie zauważono wyraźnych zmian. W czasie obserwowania populacji komórek 3, 4, 5 dniowych następowało stopniowe zmniejszanie się gęstości elektronowej jądra w całym jego obszarze. Najczęściej pozostawało wąskie pasmo chromatyny gromadzące się na brzegu jądra. Podobne zmiany w jądrze zauważyli m. in. Cohen i inni (1961), Levinthal i inni (1968), Kochhnar (1968), oraz Grzycki i Latański (1969). Podczas lizy 6 dniowej komórki najdłuższej spośród wszystkich elementów komórkowych utrzymywała się błona jądrowa.

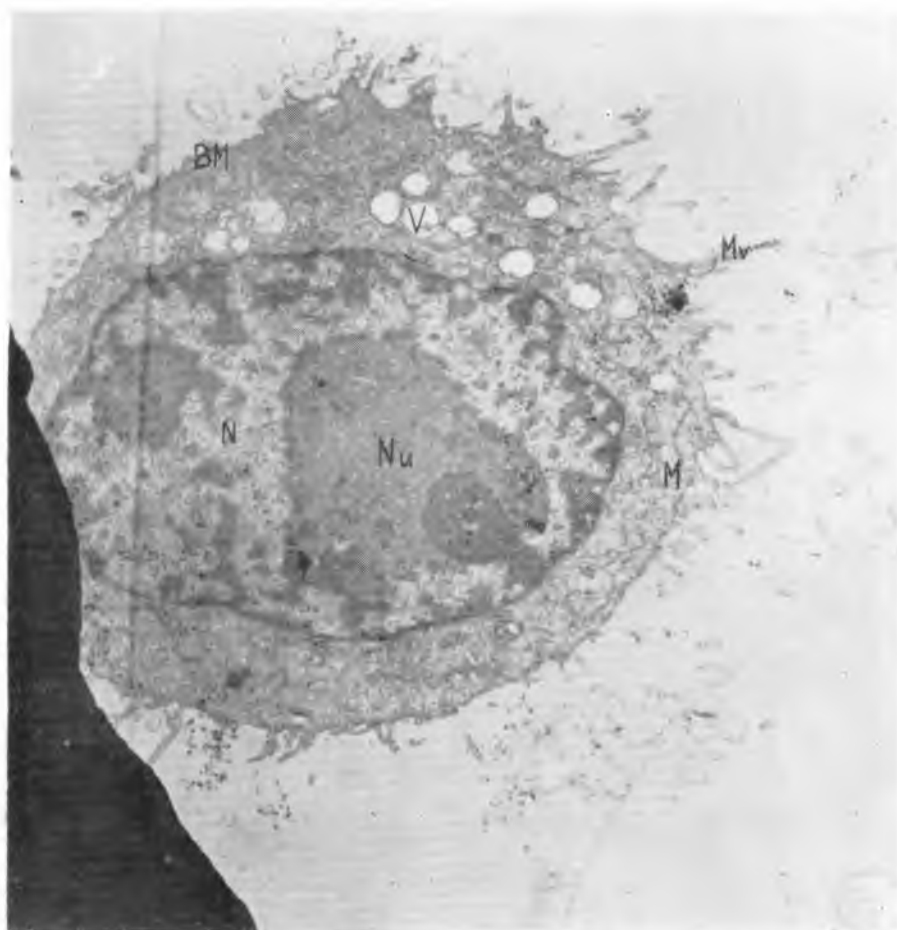
Mitochondria fibroblastów szczepu L wyróżniały się dużą zmiennością wielkości, kształtu i liczby w miarę wzrostu hodowli, przy czym największe ich występowanie dało się zauważyć w hodowli 24 godzinnej. W drugim dniu hodowli mitochondria zmniejszyły się liczebnie i zmieniły kształty, co już wyraźnie było widoczne po trzecim dniu inkubacji, w którym spostrzeżło się już tylko niewielką liczbą dużych mitochondrii. Hayward (1961) uważa, że duże mitochondria powstały przez rozwinięcie się grzebieni, tak że całkowite pole powierzchni wzrasta ze wzrostem objętości. Szczególnym zjawiskiem w komórkach w czwartym dniu hodowli było występowanie znikomej liczby mitochondriów w pobliżu szorstkich błon cytoplazmatycznych otaczających zamknięte obszary cytoplazmy tzw. pola cytosegresomalne. Biberfeld i wsp. (1966) organelle komórkowe o podobnym ułożeniu w komórce nazwali cytosegresomami. Przypuszcza się, że biegunowe zgrupowanie elementów wewnątrzkomórkowych wskazuje na szybką degenerację i lizę pozostałej części cytoplazmy w komórce. Komórki hodowli 5 dniowej zawierały m. in. pozostałość mitochondrii w postaci zwakuolizowanych tworów, które prawdopodobnie na sku-

tek głodzenia komórki, niedotlenienia, niedokarmienia, zahamowania przemiany materii i wchłonięcia dużej ilości wody uległy spęcznieniu. W pracach Dempsey (1956), Matisson i wsp. (1962) zwrócono uwagę, że mitochondria w komórkach starzejących się ulegają zmianom, a w komórkach starych znikają i niejednokrotnie przechodzą w ziarnistości gęste elektronowo. Na podstawie naszych obserwacji przypuszcza się, że duża zmienność morfologiczna mitochondrii występujących w fibroblastach szczepu L mogła być spowodowana zarówno wiekiem hodowli, jak i nagromadzeniem i nie usunięciem ze środowiska produktów przemiany materii, a także zakwaszeniem pożywki.

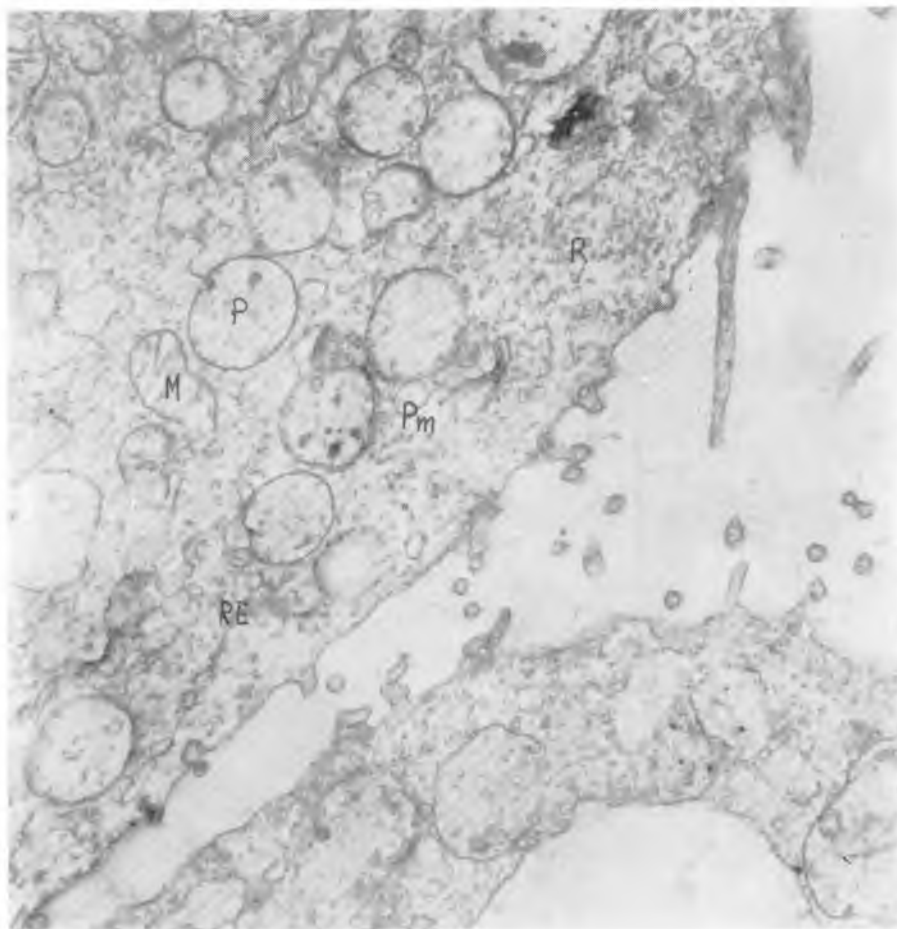
W naszej pracy zwrócono również uwagę na rozmieszczenie mitochondrii w zależności od wieku hodowli. Zauważono, że w młodej hodowli mitochondria były zlokalizowane w komórkach bardzo blisko jądra, a w miarę starzenia się hodowli migrują w kierunku zewnętrznej części cytoplazmy odsuwając się od jądra. Badania North (1961) wskazują na znaczne różnice w rozmieszczeniu mitochondrii wewnątrz komórki tej samej tkanki w różnych stadiach morfogenetycznych. Na podstawie naszych obserwacji uważa się, że mitochondria w komórkach linii ciągłej L są tworami pleomorficznymi o różnych rozmiarach, kształcie, złożoności i gęstości. Są one nietrwałe, ponieważ ich liczba uległa dużym zmianom. Istnieje możliwość, że te organelle wciąż tworzą się i znikają w pewnych stanach fizjologicznych. Przypuszczalnie łączy się to z udziałem ich w cyklicznych procesach metabolicznych.

Wyraźnym zjawiskiem występującym w obecnych badaniach było bardzo duże powiększenie struktur Golgiego i retikulum endoplazmatycznego w hodowlach starzejących się. Po pierwszym dniu hodowli nie dało się odróżnić dobrze rozwiniętego układu retikulum endoplazmatycznego i struktur Golgiego. Wzrost ergastoplazmy następował w drugim dniu, a do największego rozwoju dochodziło w trzecim i w czwartym dniu hodowli. System Golgiego w trzecim i w czwartym dniu zawierał blaszki i duże wakuole. Przestrzeń między blaszkami gamma była szeroka o małej elektronowej gęstości. Zwiększona liczba błon siatki endoplazmatycznej była widoczna szczególnie w czwartym dniu hodowli. Najczęściej otaczały one nie wielką liczbę pozostałych w komórce organelli. W przeciwieństwie do rozwijającego się kompleksu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego w hodowlach starzejących się, liczba monorybosomów i polirybosomów malała.

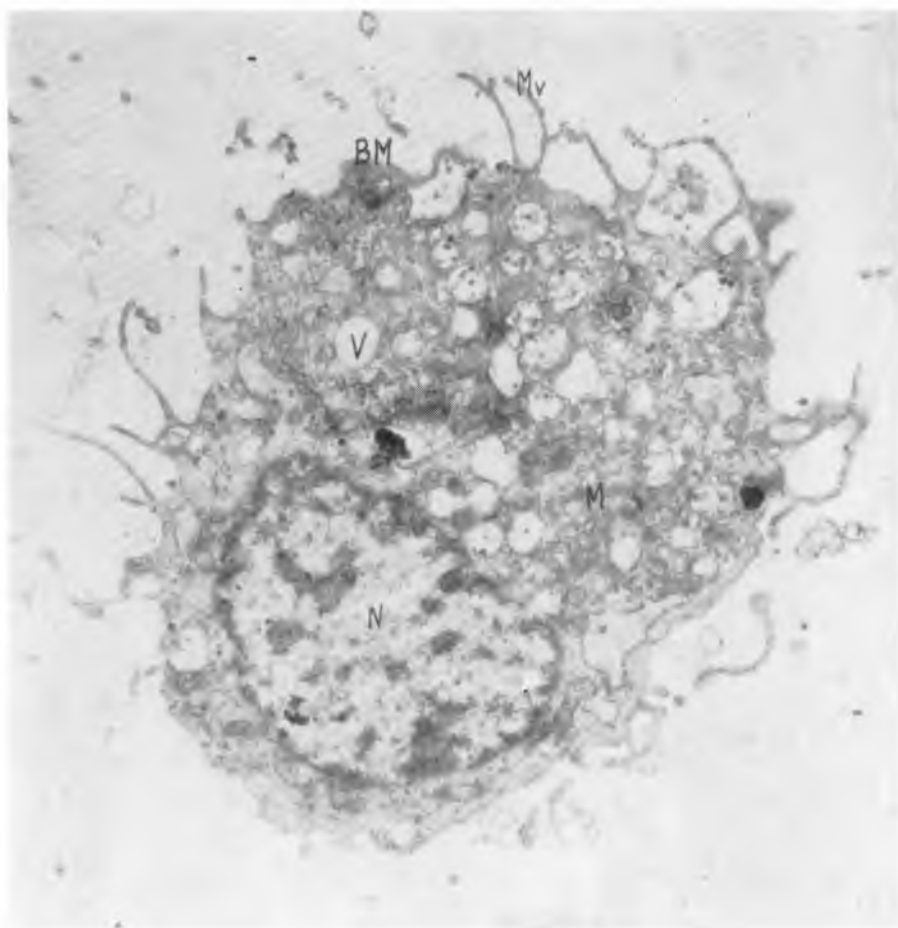
W obecnych badaniach zwrócono uwagę, że w komórkach o wyraźnie ukształtowanych strukturach Golgiego i błonach retikulum endoplazmatycznego występowały w pobliżu tych błon dobrze rozwinięte wakuole trawienne zarówno pinocytotyczne, jak i fagocytotyczne. Szmidt (1962) spostrzegł, że trawienie komórki wywołuje zwiększoną czynność systemu wakuolarnego (wakuoli i pęcherzyków) powiązanego z czynnością błon i pęcherzyków Golgiego i siatki endoplazmatycznej. W naszych badaniach wysuwa się przypuszczenie, że aparat Golgiego i retikulum endoplazmatyczne odgrywają główną rolę w końcowym etapie trawienia wewnątrzkomórkowego. Przemawia za tym fakt, że zarówno wakuole fagocytotyczne, jak i różne



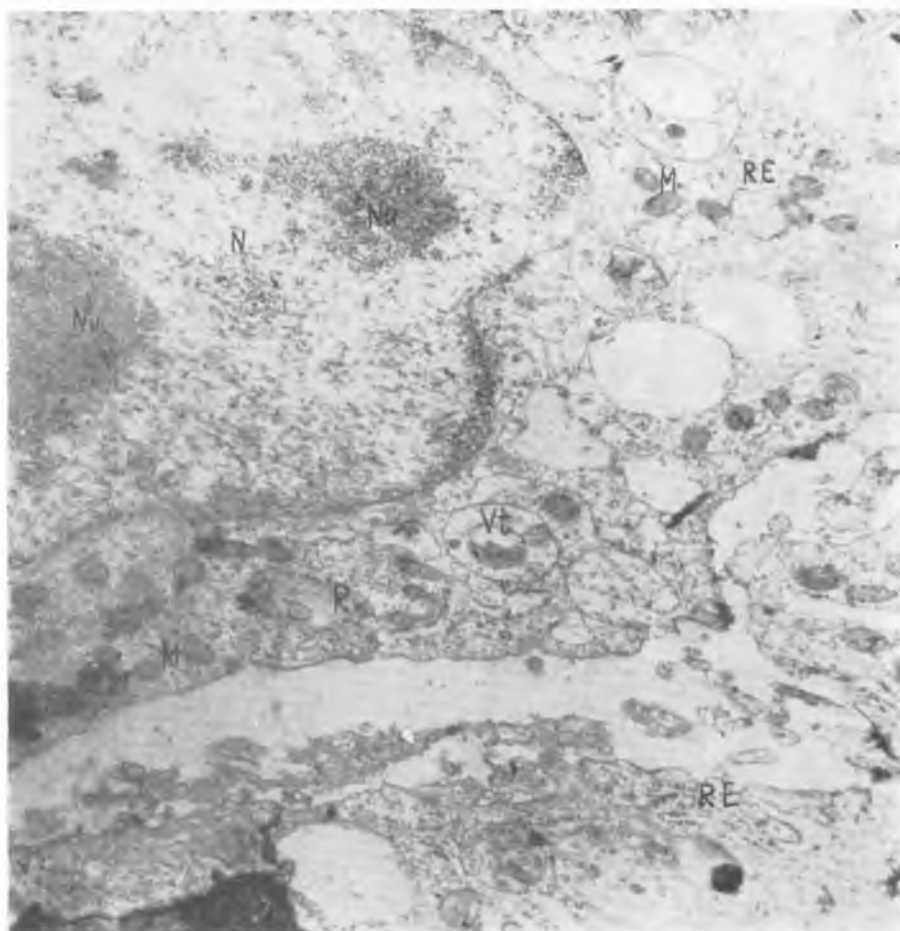
Ryc. 1



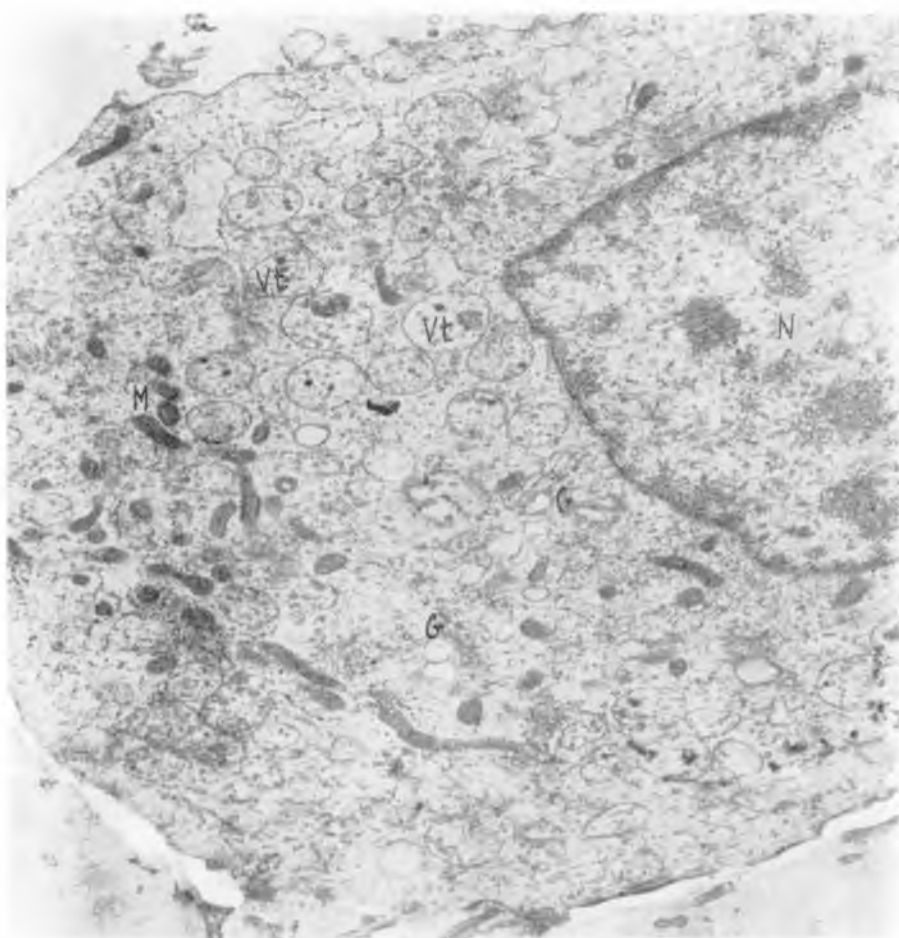
Ryc. 2



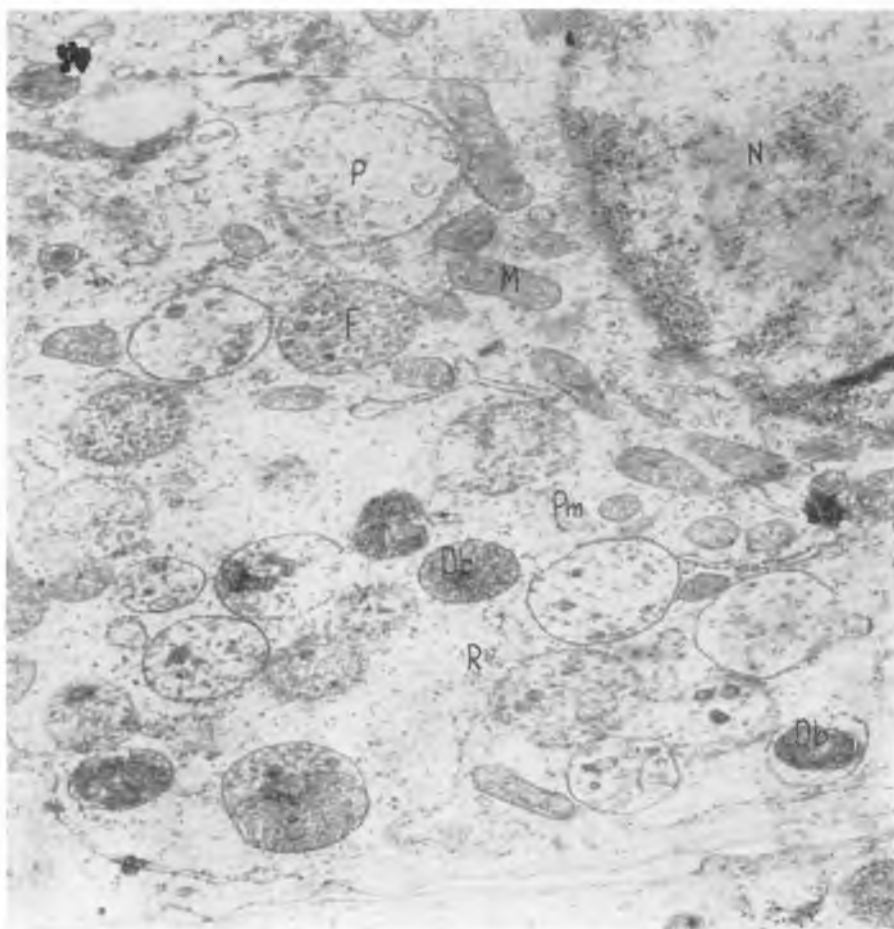
Ryc. 3



Ryc. 4



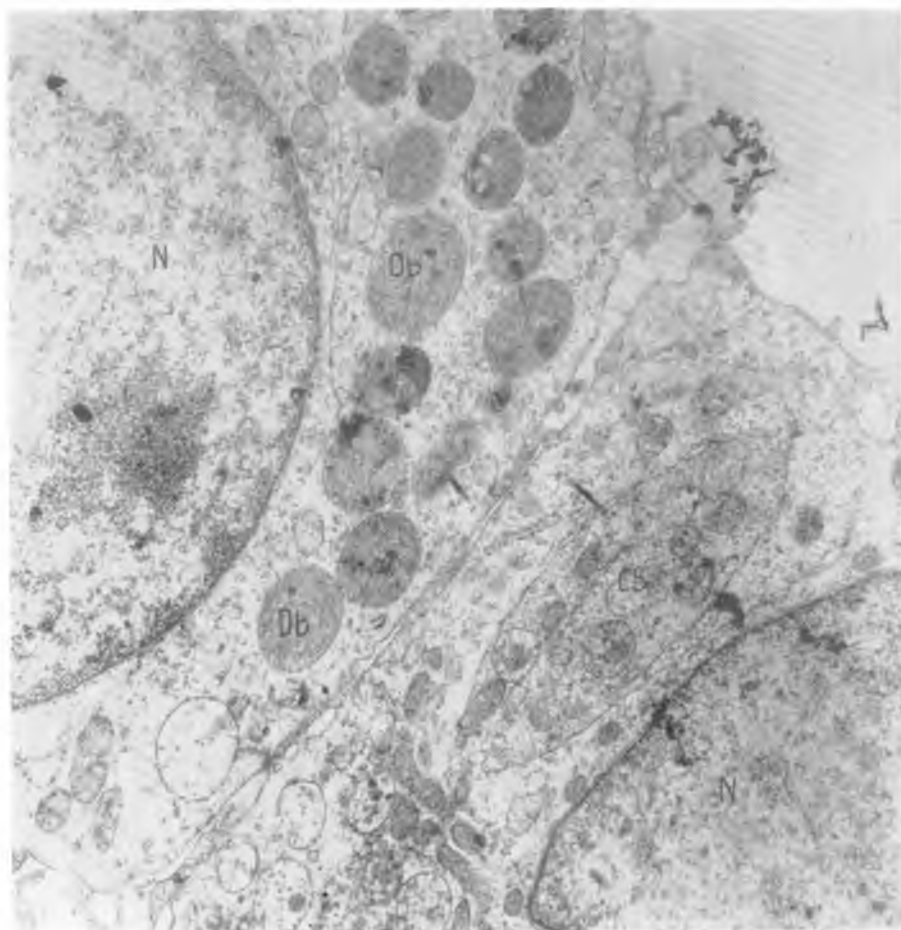
Ryc. 5



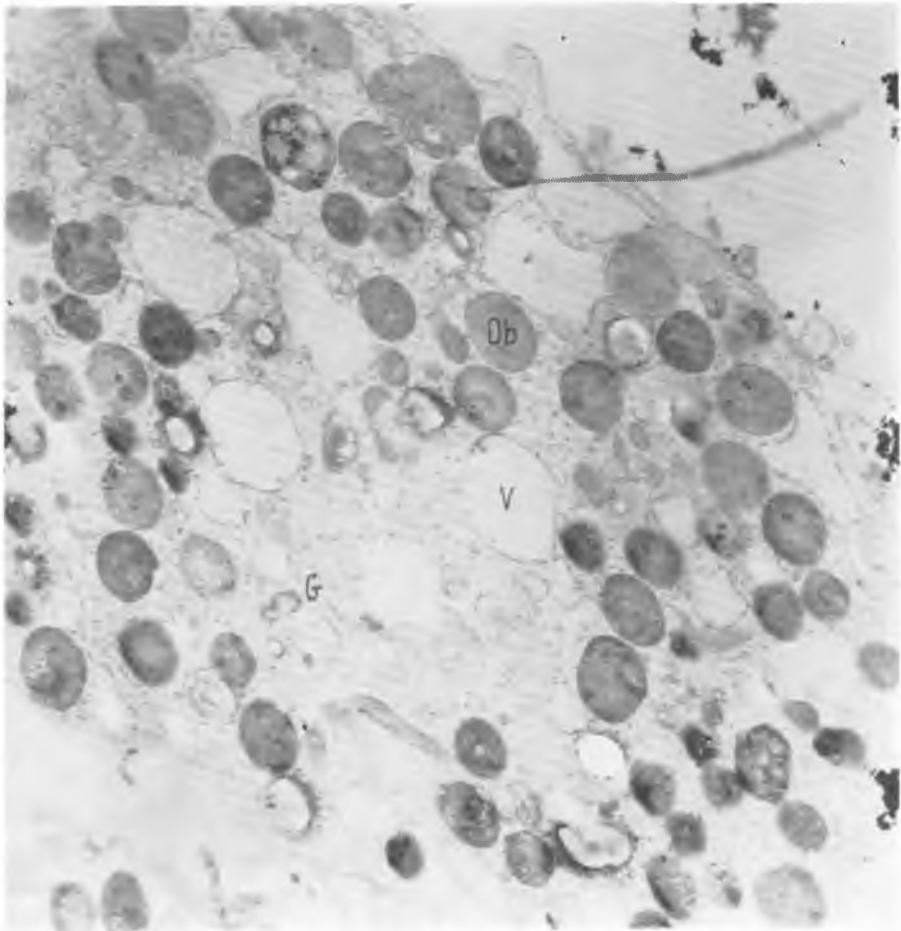
Ryc. 6



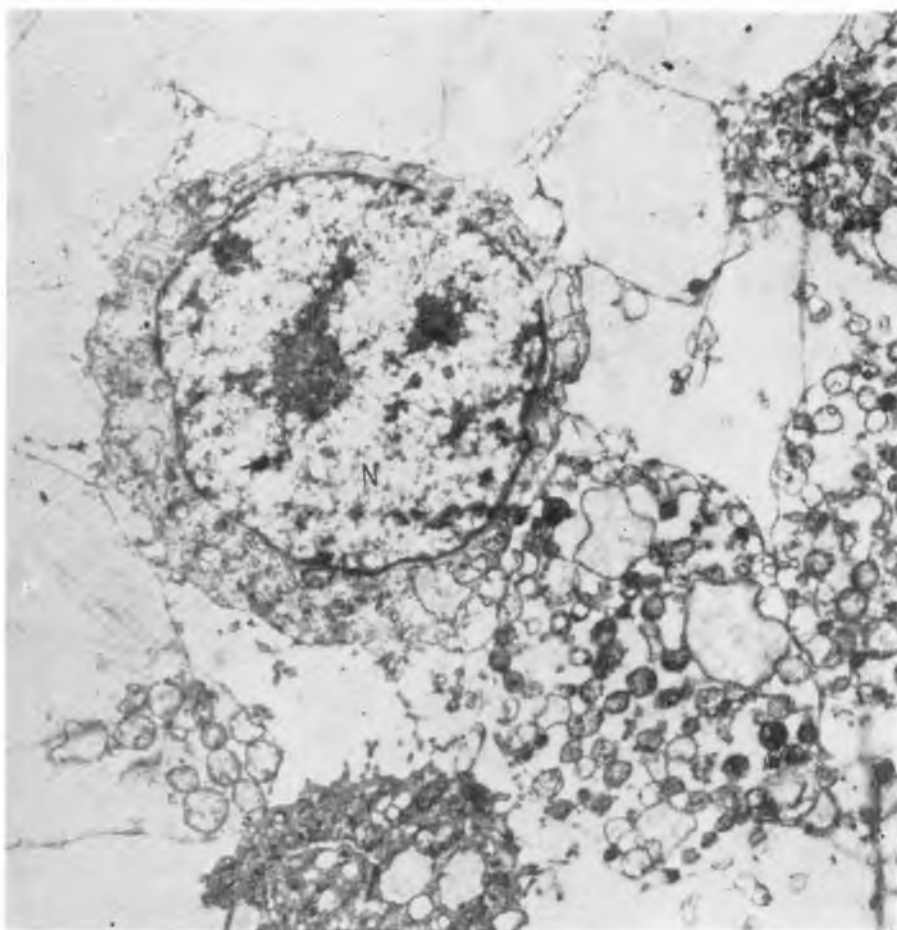
Ryc. 7



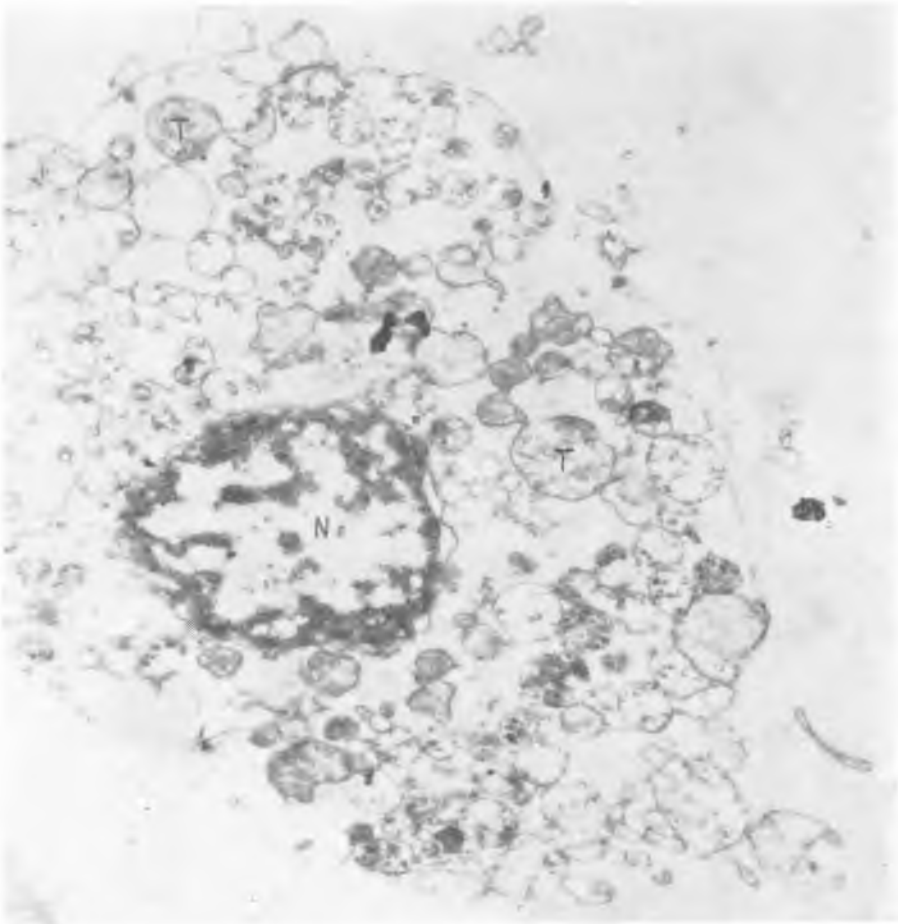
Ryc. 8



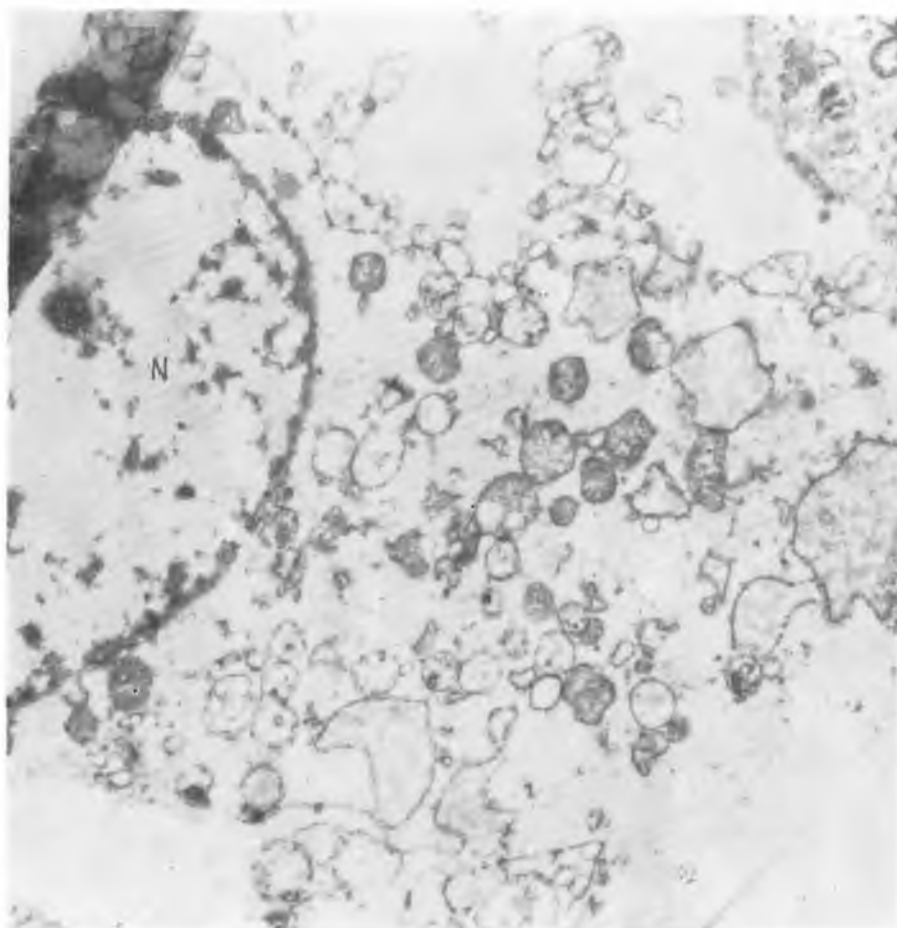
Ryc. 9



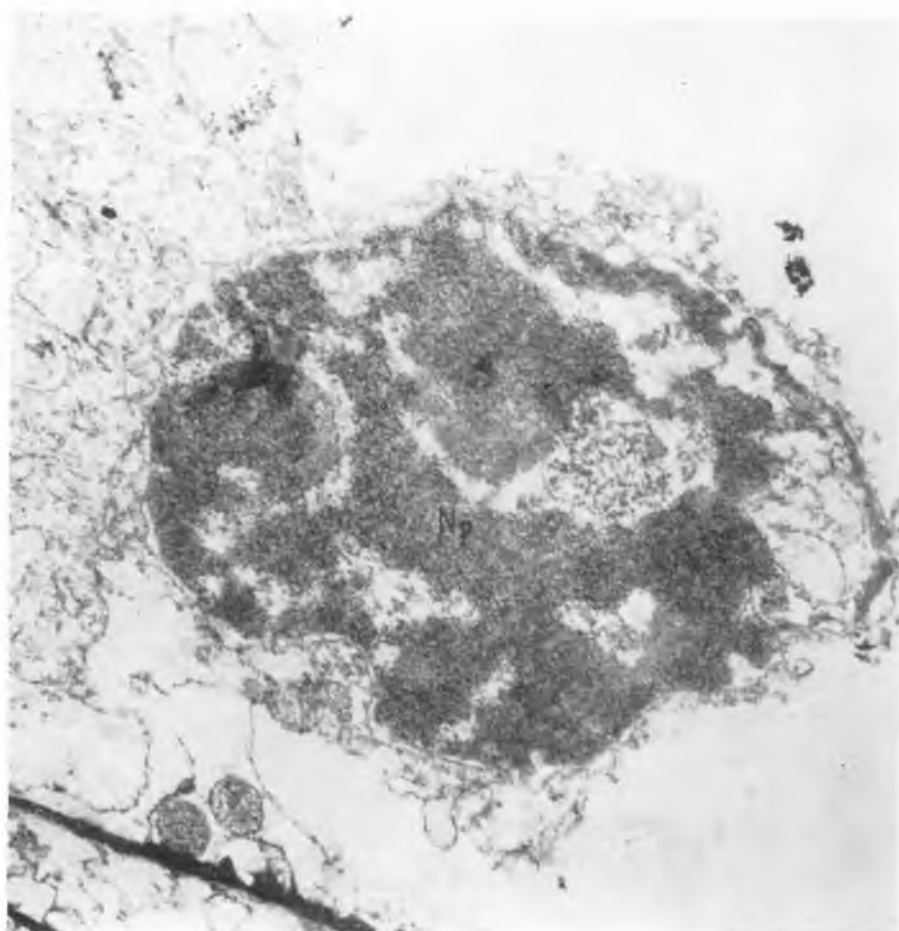
Ryc. 10



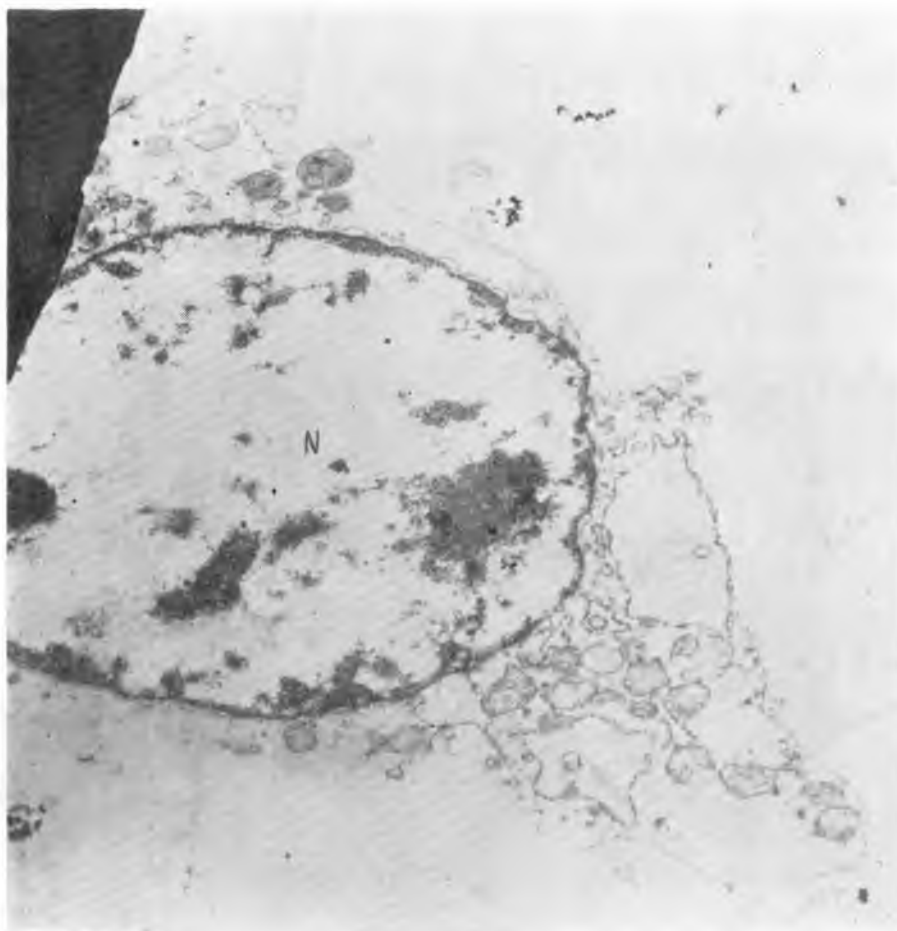
Ryc. 11



Ryc. 12



Ryc. 13



Ryc. 14

stadia budowy ciałek gęstych są w najbliższym sąsiedztwie struktur Golgiego i błon endoplazmatycznych.

W obecnej pracy zaobserwowano, że degeneracja komórek w hodowli związana była m. in. ze zmianami w aparacie trawiennym komórki. Trawienie wewnątrzkomórkowe w komórkach hodowli szczepu L wyrażało się występowaniem różnych form lizosomów, a mianowicie: wakuoli trawiennych, powstałych na drodze pinocytozy albo fagocytozy, ciałek wielopęcherzykowych, ciałek gęstych i tworów zawierających resztki organelli komórkowych. Te ostatnie nazwano wakuolami autofagowymi w hodowlach starych, a opierając się m. in. na pracy Ericssona (1968), uważamy, że powstają one w wyniku samotrawienia, albo stanów zwyrodnienia, a także w tkankach ulegających lizie fizjologicznej.

W naszych obserwacjach zauważono w pierwszym dniu inkubacji wyraźną pinocytozę, wzrastającą w hodowlach drugiego dnia. Pinocytoza malała w trzecim dniu ustępując miejsca mikropinocytozie. Na zanik pinocytozy w hodowlach w trzecim dniu inkubacji wskazuje niepołałdowana błona komórkowa, co jest zgodne z obserwacjami Franceschiniego (1966). Opierając się na pracach Riedel, Gross (1968) i Street (1966) przypuszcza się, że w naszych badaniach podczas periodycznego spoczynku pinocytozy trwa wyraźna mikropinocytoza. Mikropinocytoza występowała w trzecim i nieznacznie w czwartym dniu hodowli. Zjawisko to pozwala przypuszczać, że komórki szybko mogą przerabiać pęcherzyki mikropinocytotyczne zawierające pożywkę i nie powstają już wakuole Levisa. Zauważono również, że pinocytoza zaczyna się natychmiast po poruszeniu hodowli; pożywka, która była bardziej oddalona, dostaje się na komórki. Zjawianie się więc dużych wakuoli pinocytotycznych w czwartym dniu hodowli może być w ten sposób wytłumaczone. Pęcherzyki mikropinocytotyczne zbierają następnie substancję jeszcze całkowicie nie rozłożoną i powstają duże wakuole Levisa, które są początkowym etapem w trawieniu wewnątrzkomórkowym.

Wysuwane są różne hipotezy mówiące o procesie działania wakuoli. Opierając się na jednej z ostatnich, tzn. na hipotezie Weissenfelsa (1968) i hipotezach jego poprzedników [Essner, Novikoff (1962), Siekevitz, Palade (1960), Caro, Palade (1964)], uważa się, że dla komórek szczepu L przy karmieniu hodowli w skład pożywki wchodzi wolne aminokwasy i przede wszystkim białko surowicze. Przed syntezą aminokwasów na białko właściwe komórce, muszą być rozłożone białka surowicy cielęcej obce komórce. Wobec tego Weissenfels uważa, że proces ten przebiega wewnątrz komórki. Zbiorniki w których zachodzi to zjawisko są zawsze oddzielone od plazmy błoną. Jest to przyczyną stwierdzonego silniejszego rozwoju struktur Golgiego, który dostarcza przestrzeni ograniczonych błonami dla trawienia substratu odżywczego przenikającego do pęcherzyków pinocytotycznych. Powstają w ten sposób stopniowo skupiające się wakuole w których mikroskop elektronowy oprócz struktur pęcherzykowych zawierających pęcherzyki mikropinocytotyczne i pęcherzyki Golgiego wykazywał gęste elektronowo ziarenka, nazwane przez Harforda (1956) [cyt. z Riedel, Gross (1969)] tworami globoidal-

nymi, „globoid structures”. Wakuole wykazujące tylko budowę pęcherzykową zwane są obecnie cytosomami albo jeszcze dokładniej pinosomami [Weissenfels (1967)]. Nie ulegają one wyrzuceniu z komórki. Na podstawie dokładnych obserwacji na głodujących hodowlach szczepu L przypuszcza się, że cytosomy w końcowym etapie swego istnienia mogą ulegać rozpuszczeniu, tworzyć jasne shomogenizowane elementy albo przechodzić w ciała gęste. W naszej pracy obserwowano brak występowania pinosomów w komórkach w czwartym dniu inkubacji. Pozostaje, możliwość, że materiał, z którego wywodzą się błony pinosomów powstaje z innego materiału aniżeli wakuole Golgiego, tym bardziej że w czasie pinocytozy pierwsze wakuole pinocytotyczne powstają w pobliżu błony cytoplazmatycznej z daleka od okolicy jądra. Według przypuszczeń Riedel, Gross (1969) cytosomy mogą być raczej rozrzuconymi wakuolami Golgiego aniżeli rozszerzonymi błonami retikulum endoplazmatycznego. Pęcherzyki Golgiego wypełniające cytosomy mogą być zarówno odłączone od błon retikulum endoplazmatycznego, jak również wyrastać z woreczków Golgiego (Riedel, Gross, 1969).

W naszej pracy zjawisko fagocytozy zaobserwowano w drugim dniu hodowli komórek L. W bliskim sąsiedztwie jądra dało się zauważyć wakuole fagocytotyczne. Szczególnie intensywny proces trawienia wewnątrzkomórkowego spostrzeżono w trzecim dniu inkubacji fibroblastów. W tym wieku hodowli spotykało się wszystkie etapy trawienia fagocytotycznego. Obserwowano wakuole fagocytotyczne zawierające ciała gęste albo ziarnistości elektronowo gęste, przypuszczalnie koloidalne cząstki białka. Widoczne były różne stadia rozwoju fagosomów, ciałek wielopęcherzykowych, a także ciałek gęstych. Uważa się, że ciała gęste w komórce powstały w wyniku wcześniejszego pojawienia się wakuoli fagocytotycznych zwanych fagosomami. Obserwowane hodowle w czwartym dniu inkubacji zawierały bardzo liczne ciała gęste, które występowały prawdopodobnie jako końcowy etap istnienia aparatu fagocytotycznego. Przemawiał za tym fakt, że w tworach tych spostrzega się znaczną liczbę wakuoli. Niewielka liczba ciałek gęstych występujących w trzecim dniu i brak w piątym dniu hodowli wykazuje, że były to twory, które szybko się tworzyły i równie szybko ulegały zniszczeniu. Gordon i wsp. (1965) zauważyli pojawianie się ciałek gęstych w cztery godziny po rozpoczęciu fagocytozy i znaczny spadek liczby tych tworów w okresie 1-2 godzin w czasie trwania fagocytozy. Opierając się na własnych obserwacjach można uważać, że w czterodniowej hodowli ciała gęste ulegające dalszej wakuolizacji stanowią końcowy etap do przejścia w telolizosomy, obserwowane w piątym dniu inkubacji. De Duve (1967), (1966) i Wolna (1968) uważają, że znaczny wzrost form lizosomalnych występuje podczas fagocytozy albo podczas samotrawienia. Gordon i wsp. (1965) zauważyli że występują one często w komórkach szczepu L. W niniejszych badaniach przypuszcza się, że telolizosomy widoczne są w hodowlach stacjonarnych obserwowanych w piątym dniu inkubacji. Aktualny proces wyłaniania się ich w hodowlach L musi następować bardzo szybko, ponieważ trudno je dostrzec. Dlatego nie jest niespodzianką, że komórki hodowli starych obserwowane w piątym dniu inkubacji

zawierają liczne twory podobne do wakuoli autofagowych. Podobne wakuole obserwowali Karwacka (1967), Schuster i inni (1968). Obecność w hodowlach pięciodniowych licznych telolizosomów zawierających resztki błon, wskazywało że pochodzą one z samotrąwienia i jednocześnie dostarczają dowodów na wzajemne stosunki między fagocytozą i samotrąwieniem. Twory widoczne w piątym dniu hodowli, zawierające resztki organelli komórkowych nazwano ogólnie wakuolami autofagowymi. W obserwacjach naszych w trawieniu wewnątrzkomórkowym w hodowlach szczepu L spotykało się różne formy lizosomów. Stopniowe zmiany morfologiczne w hodowlach starzejących się i starych pozwoliły na ustalenie drogi strukturalnej ich rozkładu. Ta przypuszczalna droga widoczna jest w chronologicznej kolejności na ryc 1-14 obejmująca sześć kolejnych dni obserwowanych w obecnych badaniach. Na podstawie naszych obserwacji trudno powiedzieć z całą pewnością czy na uzyskane przez nas wyniki zmian morfologicznych wpływają czynniki samotrąwienia, stanów zwyrodnienia, czy lizy fizjologicznej ulegających tkanek, czy też zjawisko to może być spowodowane wyczerpaniem się składników odżywczych pożywki, lub nagromadzeniem substancji toksycznych w hodowlach, w których przez długi okres nie zmieniano pożywki. Być może, zastosowanie w podłożu pierwiastków znakowanych wyjaśniłoby bliżej przyczynę obserwowanych przez nas zmian.

WNIOSKI

1. Inkubacja fibroblastów szczepu L w środowisku bez odnawiania pożywki prowadzi do katabiozy spowodowanej przemianami destrukcyjnymi cytoplazmy, jądra, jąderka i pozostałych organelli.
2. W trzecim i czwartym dniu hodowli pojawiają się zmiany degeneracyjne. W tym okresie w komórkach spostrzegano najwięcej fagosomów i ciałek gęstych.
3. W piątym i szóstym dniu obserwuje się rozkład cytoplazmy wyrażający się obrzękiem i destrukcją mitochondriów, golgiolizą, obrzękiem błony jądrowej.
4. Struktura jądra wykazuje dłuższą niż cytoplazma żywotność i odporność na procesy autolityczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Biberfeld P., Ericsson J.L.E., Perlmann P., Raftell.: *Z. Zellforsch.* **71**, 153-168, 1966.
2. Bickley, Harmon: *J. Amer. Geriat. Soc.* **12**, 717-730, 1964. Cyt. wg Biol. Abstr. 20785, 1965.
3. Caro L.G., Palade G.E.: *J. Cell. Biol.* **20**, 473-496, 1964.
4. Cohen E. P., Nysten M.U., Scott D. B.: *Exp. Cell. Res.* **23**, 443-451, 1961.
5. Dempsey E.W.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 305-310, 1956.
6. de Duve C.: *Protoplazma.* **63**, 95-98, 1967.
7. de Duve C. Wattiaux.: *Ann. Rev. of Physiol.* **28**, 435-492, 1966.
8. Ericsson J.L.E.: *Exp. Cell. Res.* **55**, 95-106, 1968.
9. Essner E., Novikoff A.B.: *J. Cell. Biol.* **15**, 289-312, 1962.
10. Fischer A.: *Biology of Tissue Cells.* Cambridge. New York, Copenhagen. 1946.

11. Fortak W., Woźnicki J.: *Fol. Morph.* **27**, 337-341, 1968.
12. Franceschini M. P., Santoro A.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **42**, 1269, 1966.
13. Gordon G.B., Miller L.R., Bensch K.G.: *J. Cell. Biol.* **25**, 41-55, 1965.
14. Grzycki S., Latański M.: *Fol. Morph.* **28**, 301-311, 1969.
15. Grzycki S., Latański M.: *Z. f. mikr. anat. Forsch.* **80**, 190-202, 1969.
16. Hanks J.H.: *J. Cell. Comp. Phys.* **31**, 235, 1948.
17. Hayflick L.: *Exp. Cell. Res.* **37**, 614-636, 1965.
18. Hayward A.F.: *Exp. Cell. Res.* **24**, 198-200, 1961.
19. Honjo, Ichio.: *J. Biochem. (Tokyo)*. **64**, 311-320, 1968. *Cyt. wg Biol. Abstr.* 53791, 1969.
20. Kaplan D., Meyer K.: *Nature*. **183**, 1267, 1959.
21. Karwacka H.: *Fol. Morph.* **26**, 471-476, 1967.
22. Ketz, Hans-Albrecht.: *Wiss. Zeit. Karl Marx-Univ. Leipzig*. **11**, 647-652, 1962. *Cyt. wg Biol. Abstr.* 20795, 1965.
23. Kochhner O.S.: *Exp. Cell. Res.* **49**, 598-611, 1968.
24. Kohn R. R., Roy G.F.: *Exp. Mol. Pathol.* **3**, 51-56, 1964. *Cyt. wg Biol. Abstr.* 19831, 1965.
25. Kojima K., Kozuka S.: *J. Cell. Biol.* **14**, 141-144, 1962.
26. Levinthal J.D., Rubin H.: *Exp. Cell. Res.* **52**, 667-672, 1968.
27. Matisson A.G.M., Aksel Birch-Andersen.: *J. Ultrastructure Res.* **6**, 205-228, 1962.
28. North R.J.: *J. Ultrastr. Res.* **5**, 497-503, 1961.
29. Palmer C.G., Hodes M.E., Warren A.K.: *Exp. Cell. Res.* **24**, 429-439, 1961.
30. Paul J.: *Cell and tissue culture*. E.S. Livingstone LTD. Edinburgh-London 1960.
31. Raynold Z. D.: *Histological techniques for electron microscopy*. *Cyt. wg Daniel C. Pease*. Academic Press. New York and London (wyd. II) 1964.
32. Riedel B., Gross W.O.: *Z. Zellforsch.* **92**, 360-366, 1968.
33. Riedel B., Gross W. O.: *Z. Zellforsch.* **94**, 220-231, 1969.
34. de Robertis E.D.P., Nowiński W.W., Saez F.A.: *Cytologia*. PIW. 1969.
35. Schuster Fl., Hershenov., Aronson S.: *J. Protozool.* **15**, 335-346, 1968.
36. Siekevitz P., Palade G.E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 619-620, 1960.
37. Szmidt W.: *Z. Zellforsch.* **58**, 573-637, 1962.
38. Stockwell R.A., Scott J.E.: *Ann. Rheum. Dis.* **24**, 341, 1965.
39. Street H. E.: *The nutrition and metabolism of plants tissue and organ cultures*. *Cyt. wg Willmer E.N. ed: Cells and tissues in culture*. **3**, 533, London and New-York, 1966.
40. Weissenfels N.: *Histochemie* **9**, 189-207, 1967.
41. Weissenfels N.: *Z. Zellforsch.* **86**, 1-13, 1968.
42. Wolna E.: *Postępy Hig. i Med. Dośw.* **22**, 215-221, 1968.

Otrzymano 16 XI 1970.

Objaśnienia rycin

Ryc. 1. Fibroblast szczepu L — jednodniowa hodowla. BM—błona komórkowa, M-mitochondria, Mv-wypustki protoplazmatyczne, N-jądro, Nu-jąderko, V-wakuole elektronowo jasne. Pow. 12780x

Ryc. 2. Fragment komórki jednodniowej hodowli. M-mitochondria, R-rybosomy, RE-retikulum endoplazmatyczne, P-pinosomy, Pm-pęcherzyki mikropinocytotyczne. Pow. 12780x.

Ryc. 3. Fibroblast hodowli 48 godz. BM-błona komórkowa, M-mitochondria, Mv-wypustki protoplazmatyczne, N-jądro, V-wakuole elektronowo jasne. Pow. 12780x.

Ryc. 4. Fragment komórki z hodowli 48 godz. M-mitochondria, N-jądro, Nu-jąderko, R-rybosomy, RE-retikulum endoplazmatyczne, Vt-wakuole trawienne. Pow. 36000x.

Ryc. 5. Część komórki utrwalona z hodowli 72 godz. G-struktury Golgiego, M-mitochondria N-jądro, Vt-wakuole trawienne. Pow. 22320x.

Ryc. 6. Część komórki z hodowli 72 godz. Db-ciałka gęste, F-fagosomy, M-mitochondria, N-jądro, P-pinosomy, Pm-pęcherzyki mikropinocytotyczne, R-rybosomy, RE-retikulum endoplazmatyczne. Pow. 45000x.

Ryc. 7. Fragmenty dwóch fibroblastów z hodowli 96 godz. CS-pola cytosegresomalne, N-jądro Pm-pęcherzyki mikropinocytotyczne. Pow. 22320x.

Ryc. 8. Fragmenty komórek hodowli 96 godz. CS-pola cytosegresomalne, Db-ciałka gęste, N-jądro. Pow. 27000x.

Ryc. 9. Środkowe części komórki z hodowli 96 godz. Db-ciałka gęste, G-struktury Golgiego, V-wakuole elektronowo jasne. Pow. 22320x.

Ryc. 10. Fibroblast z hodowli 120 godz. N-jądro. Pow. 11160x.

Ryc. 11. Komórka z hodowli 120 godz. N-jądro, T-telolizosomy. Pow. 12780x.

Ryc. 12. Utrwalona komórka z 120 godz. hodowli. N-jądro. Pow. 22320x.

Ryc. 13. Komórka z 144 godz. hodowli. Np-jądro pyknotyczne. Pow. 36000x.

Ryc. 14. Komórka utrwalona z hodowli 144 godz. N-jądro. Pow. 45000x.

РЕЗЮМЕ

При помощи электронного микроскопа исследовали процесс постепенных изменений, происходящих в стабильной культуре фибробластов L, которые находились в той самой питательной среде до полной деструкции. Для исследований применяли трипсинизованные клетки культуры штамма L, которые размножались в бутылке Legroux и выращивались в жидкостях Паркера и Ханкса с добавлением 10% сыворотки телят. После 1, 2, 3, 4, 5 и 6 дня инкубации культуру закрепили в растворе OsO₄, потом промыли в растворе Рингера и залили вестопалом.

По мере старения культуры фибробластов L происходят основные изменения, которые приводят к катаболизму клетки, вызванному деструкционными изменениями цитоплазмы, ядра, ядрышка и остальных внутриклеточных органов. На 3 и 4 день разведения заметили больше всего фагосомов и густых телец. На 5 и 6 день наблюдали распад цитоплазмы, выражающийся в отеке и деструкции митохондрий, системы Гольги, отеке ядерной оболочки. Структура ядра обладала более длительной жизнеспособностью и иммунитетом против процессов аутолиза, чем цитоплазма.

SUMMARY

Fibroblasts of an established L line, which were left in unchanged culture medium up to complete destruction, were studied under an electron microscope in the course of changes. For examinations there were used the trypsinized cells of L line, which were cultured in Legroux flasks in Parker's fluid and Hanks solution (1:1) with addition of 10% of calf serum. After 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days of incubation the

cultures were fixed in osmium tetroxide solution, then rinsed with Ringer's solution, and embedded in vestopal.

In the course of culture ageing there occurred destructive changes in the cytoplasm, nucleus, nucleolus and organelles, which led to the catabiosis of a cell. The largest number of phagosomes and dense bodies was noted on the third and fourth day of culture. During the fifth and sixth day of culture the swelling and disintegration of mitochondria, disintegration of Golgi apparatus as well as swelling of the nuclear membrane were observed. The nuclear structures were most resistant to autolytic processes.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Fibroblast of the L line after one day of culture. BM -- cell membrane, M -- mitochondria, Mv -- protoplasmic microvilli, N -- nucleus, Nu -- nucleolus. V -- electron bright vacuoles. Magn. 12,780x.

Fig. 2. Fragment of a cell after one day of culture. M -- mitochondria, R -- ribosomes, RE -- endoplasmic reticulum, P -- pinosomes, Pm -- micropinocytotic vesicles. Magn. 12,780x.

Fig. 3. Fibroblast after 48 hours of culture. BM -- cell membrane, M -- mitochondria, Mv -- protoplasmic microvilli, N -- nucleus, V -- electron bright vacuoles. Magn. 12,780x.

Fig. 4. Fragment of a cell after 48 hours of culture. M -- mitochondria, N -- nucleus, Nu -- nucleolus, R -- ribosomes, RE -- endoplasmic reticulum, Vt -- digestive vacuoles. Magn. 36,000x.

Fig. 5. Part of a cell fixed after 72 hours of culture. G -- Golgi structures, M -- mitochondria, N -- nucleus, Vt -- digestive vacuoles. Magn. 22,320x.

Fig. 6. Part of a cell after 72 hours of culture. Db -- dense bodies, F -- phagosomes, M -- mitochondria, N -- nucleus, P -- pinosomes, Pm -- micropinocytotic vesicles, R -- ribosomes, RE -- endoplasmic reticulum. Magn. 45,000x.

Fig. 7. Fragments of two fibroblasts after 96 hours of culture. CS -- fields of cytosegresomes, N -- nucleus, Pm -- micropinocytotic vesicles. Magn. 22,320x.

Fig. 8. Fragments of cells after 96 hours of culture. CS -- fields of cytosegresomes, Db -- dense bodies, N -- nucleus. Magn. 27,000x.

Fig. 9. Central part of the cell after 96 hours of culture. Db -- dense bodies, G -- Golgi structures, V -- electron bright vacuoles. Magn. 22,320x.

Fig. 10. Fibroblast after 120 hours of culture. N -- nucleus. Magn. 11,160x.

Fig. 11. A cell after 120 hours of culture. N -- nucleus, T -- thelolyosomes. Magn. 12,780x.

Fig. 12. A fixed cell after 120 hours of culture. N -- nucleus. Magn. 22,320x.

Fig. 13. A cell after 144 hours of culture. Np -- pyknotic nucleus. Magn. 36,000x.

Fig. 14. A fixed cell after 144 hours of culture. N -- nucleus. Magn. 45,000x.